

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Documentos

ISSN 0103 - 0205
Novembro, 2007

170

**Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico
ou Imaturo, no Melhoramento Vegetal.**



Embrapa



ISSN 0103-0205
Outubro, 2007

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

Documentos 170

Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou
Imaturo, no Melhoramento Vegetal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Silvany de Sousa Araújo

Campina Grande, PB.
2007

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Algodão
Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário
Caixa Postal 174
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB
Telefone: (83) 3315-4300
Fax: (83) 3315-4367
algodao@cnpa.embrapa.br
<http://www.cnpa.embrapa.br>

Comitê de Publicações

Presidente: Nair Helena Castro Arriel
Secretária: Nívia Marta Soares Gomes
Membros: Demóstenes Marcos Pedroza de Azevêdo
 Everaldo Paulo de Medeiros
 Fábio Aquino de Albuquerque
 Francisco das Chagas Vidal Neto
 João Luiz da Silva Filho
 José Wellington dos Santos
 Luiz Paulo de Carvalho
 Nelson Dias Suassuna
Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes
Revisão de Texto: Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Tratamento das Ilustrações: Oriel Santana Barbosa
Capa: Flávio Tórres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley
Editoração Eletrônica: Oriel Santana Barbosa

1ª Edição
1ª impressão (2007) 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo, no Melhoramento Vegetal, Julita Maria Frota Chagas Carvalho. Campina Grande, 2007

35p. (Embrapa Algodão. Documentos, 170)

1. Biotecnologia 2. Embrião Zigótico - Cultivo I. Título. II. Série.

CDD 620.8

© Embrapa 2007

Autores

Julita Maria Chagas Frota Carvalho

Eng. agrôn. D.Sc. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143,
Centenário, CEP 58107-720, Campina Grande, PB, E-mail:
julita@cnpa.embrapa.br

Silvany de Sousa Araújo

Graduando do Curso de Ciências Biológicas da UEPB, E-mail:
ny_araujo@hotmail.com

Apresentação

O desenvolvimento da técnica de cultivo de embrião in vitro é de importância fundamental no melhoramento genético de plantas, a fim de regenerar embriões de sementes, dos acessos do Banco de Germoplasma, que não germinaram em condições convencionais de semeadura, e permitir a superação de barreiras genética à germinação e a introgressão genica por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies distintas, o que contribui para acelerar a obtenção de cultivares de melhor desempenho global. Com este trabalho, a Embrapa Algodão coloca a disposição da comunidade científica, informações sobre a técnica de cultivo de embriões.

Robério Ferreira dos Santos
Chefe Geral da Embrapa Algodão

Sumário

Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo, no Melhoramento Vegetal	11
Introdução	11
Histórico.....	12
Fisiologia do Embrião Zigótico.....	13
Fatores que Afetam a Cultura de Embrião.....	14
Reguladores de Crescimento.....	18
Condições Ambientais de Cultivo.....	18
Aplicação da Cultura de Embriões	19
Micropropagação Clonal.....	23
Superação de Esterilidade e Dormência de Sementes.....	24
Conclusão	25
Referências Bibliográficas	25

Aplicação do Cultivo de Embrião Zigótico ou Imaturo, no Melhoramento Vegetal

Julita Maria Frota Chagas Carvalho
Silvany de Sousa Araújo

Introdução

As técnicas de engenharia genética na área vegetal estão avançando rapidamente. Os métodos de regeneração de plantas constituem condição essencial para se alcançar as metas da engenharia genética. A regeneração de plantas a partir do cultivo de embrião in vitro é uma técnica utilizada há bastante tempo; já em 1941, Van Overbeek conseguiu que embriões imaturos desenvolvessem, pela suplementação de sacarose, sais minerais e leite de coco (WAREING et al., 1970).

Segundo Nuñez e Becerril (1996), a técnica de cultivo in vitro de embriões zigóticos é um procedimento muito comum no melhoramento de plantas para regenerar embriões de sementes que não germinam em condições convencionais de semeadura. No entanto, sua maior aplicabilidade se dá por meio do resgate de embriões imaturos a partir de sementes em desenvolvimento.

As aplicações da cultura de tecidos têm sido empregadas de diferentes formas no desenvolvimento de cultivares superiores de plantas; em geral, essas técnicas são utilizadas em uma ou outra etapa do melhoramento, não necessariamente no desenvolvimento direto de novas cultivares, mas

podem oferecer novas alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecem soluções únicas; isto acontece com o emprego da cultura de embriões visando a introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies distantes. São inúmeros os exemplos em que a introgressão de genes de importância agrônômica de um acesso silvestre para uma cultivar comercial foi realizada com o auxílio de cultura de embriões; assim, a contribuição das técnicas de cultura de tecidos e células nos programas de melhoramento pode se dar em maior ou menor escala, de acordo com os objetivos do melhoramento e com as características biológicas da espécie-alvo (FERREIRA et al., 1998).

Histórico

Desenvolveram-se, no início de 1900, técnicas que possibilitaram o salvamento de sementes imaturas ou embriões de plantas adultas para formar pequenas plantas, o que já era praticado, principalmente com sementes que tinham um período de inatividade muito longo ou quando as sementes eram particularmente heterogêneas (FERREIRA et al., 1990).

Hannig (1904) foi o primeiro a cultivar, in vitro, embriões imaturos de crucíferas (*Raphanus sativus*, r. *caudatus* e *colchlearia danica*); ele observou a necessidade de suplementação do meio mineral com sacarose para germinação dos embriões e mostrou o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a sua morfologia. Desde então, pesquisas nesta área têm trazido grandes contribuições para melhor entendimento dos processos fisiológicos relacionados com a germinação. Posteriormente, Knudson (1922) cultivou embriões de orquídeas na ausência de micorrizas e notou que a sacarose era importante para o crescimento e desenvolvimento desses embriões in vitro. Dieterich (1924) mostrou que embriões cultivados não apresentavam dormência. Laibach (1925) foi o primeiro a visualizar a aplicação prática da cultura de embriões no melhoramento genético, recuperando plantas híbridas de cruzamentos incompatíveis entre *Linum austriacum* X *L. perenne*.

Com os contínuos desenvolvimentos na cultura de tecido, esta técnica também foi usada para salvar embriões de óvulos que haviam sido fertilizados mas nunca se desenvolveram em sementes viáveis na planta-mãe. Inicialmente, ovários completos eram colocados em cultura de tecido, por onde eram obtidas mudas de embriões que teriam morrido em uma fase posterior de desenvolvimento. O salvamento de embriões que haviam morrido em uma fase prematura de desenvolvimento, veio em um estágio posterior, resultando em técnicas de alta tecnologia de cultura de óvulos e embriões. Uma combinação dessas técnicas é freqüentemente usada: partes dos ovários são colocadas em cultura de tecido e depois disso, a cultura de óvulos e/ou embriões é aplicada. Desde então, a técnica de cultura de embriões tem se expandido e ensejado significativas contribuições em estudos básicos da fisiologia do desenvolvimento do embrião, em programas de melhoramento genético, pela recuperação de híbridos de interesse de cruzamentos incompatíveis, e para a quebra de dormência de sementes, observada em algumas espécies (FERREIRA et al., 1990).

Fisiologia do Embrião Zigótico

A terminologia 'cultura de embrião' tem sido empregada para descrever os processos de crescimento de embrião zigótico in vitro, independente da idade, tamanho e estágio de desenvolvimento em que o embrião foi excisado (RAPPAPOT, 1954).

A formação do embrião zigótico inicia-se após a fecundação da oosfera, por um dos núcleos gaméticos do grão de pólen (FERRI, 1990). O desenvolvimento do embrião zigótico tem início com a diferenciação de uma estrutura bipolar, constituída de ápice caulinar e radicular, passando pelos estádios de desenvolvimento pró-embrionários e embrionários propriamente ditos: globular, cordiforme, torpedo e cotiledonar.

Na medida em que o embrião zigótico se desenvolve, ocorrem mudanças progressivas na sua exigência nutricional, passando de heterotrófico a autotrófico. A distinção entre essas duas fases se baseia na dependência do embrião pelas substâncias nutritivas armazenadas no endosperma.

Inicialmente, o zigoto e o embrião têm, nas fases subseqüentes à fecundação, pouca capacidade de síntese e se utilizam das reservas nutricionais, reguladores de crescimento e outros metabólitos essenciais presentes no endosperma e células acessórias do saco embrionário. Ainda no estágio globular o embrião continua sendo heterotrófico. Somente a partir do estágio cordiforme final, com início do desenvolvimento dos cotilédones, é que o embrião começa a se tornar independente e autotrófico (RAGHAVAN, 1976).

Fatores que Afetam a Cultura de Embrião

Diversos são os fatores que afetam a eficiência e o sucesso da cultura de embriões in vitro, tais como a maturidade fisiológica da semente, a desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado, os reguladores de crescimento utilizados, as substâncias fenólicas liberadas e as condições ambientais de cultivo.

Maturidade fisiológica da semente

Segundo Raghavan (1980), a utilização de sementes fisiologicamente maduras requer apenas a presença de sais inorgânicos e sacarose no meio de cultura para germinação e desenvolvimento dos embriões, em virtude de possuírem estrutura bipolar desenvolvida e passarem rapidamente para o estado autotrófico.

Desinfestação da semente

As sementes e frutos devem ter a superfície desinfestada e os embriões excisados assepticamente dos tecidos que o cercam, razão por que a contaminação em cultura de embrião é mínima. Hipoclorito de sódio e etanol são os desinfestantes de uso mais freqüente; humectantes, tais como Tween 20 ou 80 (0,01 a 0,1%), ou detergentes podem ser adicionados à solução desinfestante, aumentando a eficiência do procedimento. Embora não seja essencial, o resíduo do desinfestante na superfície da semente ou fruto pode ser eliminado por lavagens com água estéril (FERREIRA e HU, 1998).

Excisão do embrião imaturo

A remoção dos embriões pequenos é realizada em câmara asséptica, com o auxílio do microscópio estereoscópico, para melhor visualização dos embriões imaturos.

A excisão do embrião imaturo, quando o endosperma ainda está líquido, pode ser feita por meio de uma incisão na porção terminal do saco embrionário, junto à micrópila, seguida da aplicação de uma pressão, na outra extremidade para forçar a expulsão do embrião através do corte. O suspensor, que é a conexão entre o tecido materno e o embrião, e por onde este se nutre, deve ser mantido preferencialmente quando o embrião é excisado no estágio globular. Há evidências claras de que o suspensor é um local ativo de biossíntese de substância de crescimento, imprescindíveis para o desenvolvimento dos embriões zigóticos excisados, mesmo quando em seus estádios iniciais (CECCARELLI et al., 1981; PIAGGESI et al., 1991; PICCIARELLI et al., 1991).

A desidratação dos embriões imaturos pode ser contornada pela adição de meio de cultura ou água sobre o embrião evitando, assim, sua injúria.

Meio de cultivo adequado

A primeira etapa a ser superada para o início do cultivo in vitro de qualquer espécie, é a utilização de um meio de cultura apropriado. As exigências nutricionais para o crescimento in vitro variam com a espécie e mesmo explantes excisados de diferentes partes de uma planta podem requerer meios de cultura distintos para o seu crescimento (PASQUAL, 2001). Desta forma, tem-se buscado novos meios nutritivos que se aproximem da composição do endosperma ou saco embrionário e possibilitem o desenvolvimento dos embriões, independentemente da fase em que se encontram (ANDREOLI, 1986).

Quanto mais jovem for o embrião, mais complexa será a exigência nutricional que permita o seu desenvolvimento (FERREIRA e HU, 1998). Embriões excisados no estágio de torpedo exigem, para o seu

desenvolvimento, sais minerais, sacarose e vitaminas, e no estágio cordiforme a adição de hormônios a este meio é indispensável; já no estágio globular inicial as exigências são desconhecidas (RAGHAVAN, 1966).

Um aspecto significativo da cultura de embrião imaturo é se definir um meio de cultura que possa sustentar o seu crescimento e desenvolvimento. Durante o desenvolvimento do embrião imaturo em cultura, deve-se esperar mudanças progressivas de suas necessidades nutricionais, o que, muitas vezes, significa transferir o embrião de um meio para outro até a otimização do seu crescimento (FERREIRA e HU, 1998).

Monnier (1978) desenvolveu um método no qual dois meios, de diferentes composições são colocados em justaposição na placa de Petri, e o primeiro meio, em solidificação do ágar, o frasco central é removido sendo, então, adicionado o segundo meio; os embriões são cultivados neste segundo meio que, com o tempo, varia de composição, em razão da difusão recíproca entre os dois meios. Com este procedimento, embriões de *Capsella* cultivados no estágio inicial globular, se desenvolveram até a maturidade sem transferências subsequentes para o novo meio de cultivo.

a) Sais inorgânicos

O meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) é conhecido como de alto conteúdo de sais, enquanto o meio White (SINGH e KRIKORIAN, 1981) é considerado de baixa concentração salina (KRIKORIAN, 1991). Os meios WPM e Knudson possuem aproximadamente $\frac{1}{4}$ da concentração de íons nitrato e amônio do meio de cultura MS (PASQUAL, 2001). Para as coníferas, o meio LP (ARNOLD e ERIKSSON, 1981) também é muito utilizado (TAUTORUS et al., 1991).

b) Carboidratos

Em algumas espécies de plantas, como os citros, há tendência de ocorrer germinação de embriões imaturos originando plântulas fracas e mal formadas. Pelo fato de meios de cultura com elevada pressão osmótica suprimirem a germinação precoce, alta concentração de sacarose tem sido utilizada para minimizar esses efeitos (PASQUAL e PINTO, 1988).

Segundo Grattapaglia e Machado (1990), as plantas cultivadas in vitro requerem uma fonte de energia exógena pois não dispõem de condições adequadas para a realização da fotossíntese, ante o que a sacarose tem sido a fonte de carbono mais empregada, estando presente em meios de cultura em concentrações que variam de 20 a 40 g.L⁻¹ (FERREIRA et al., 2002); portanto, variações na concentração deste carboidrato no meio de cultivo afetam as condições osmóticas e o metabolismo da planta in vitro, influenciando no crescimento e no metabolismo das culturas (KUMAR et al., 1984; OZAIAS-AKINS e VASIL, 1982). Em geral, quanto mais jovem for o embrião excisado, mais alta será a osmolaridade requerida no meio (FERREIRA e HU, 1998). Em alguns casos, especialmente para gramíneas, outros açúcares, como a maltose (SCOTT e LYNE, 1994; STIVAL, 1995), ou frutose (FOLEY, 1992) são mais eficientes.

c) Nitrogênio

Nitratos de potássio e de amônio são as fontes de nitrogênio inorgânico mais frequentemente usadas. A utilização de nitrogênio em uma dessas duas formas, depende da espécie e do grau de maturidade do embrião. Quando a amônia é adicionada ao meio de cultura de embrião, é preferível combiná-la com ácido orgânico, especialmente málico ou cítrico (FERREIRA e HU, 1998).

Entre os vários aminoácidos e suas amidas, a glutamina é a substância mais efetiva no estímulo ao crescimento de embriões in vitro. A asparagina também é bastante efetiva em alguns gêneros como, por exemplo, *Datura* (PARIS et al., 1953), mas inibitória em outros gêneros, como *Arabidopsis*, *Capsella* e *Reseda* (RIJVEN, 1955); já a caseína hidrolisada (CH, mistura complexa de aminoácidos) é comumente usada no meio de cultura para estimular o crescimento e o amadurecimento do embrião (FERREIRA e HU, 1998).

d) pH do meio nutritivo

O pH é um fator crítico e muito importante do meio de cultura, influenciando na disponibilidade de nutrientes, fitorreguladores e no grau de solidificação do ágar. Se bem ajustado, o pH pode promover maior e melhor

aproveitamento dos nutrientes pelo explante. Os efeitos do pH podem ser diretos ou indiretos influenciando, por exemplo, na utilização das fontes de nitrogênio. Valores de pH mais baixos (meios de cultura mais ácidos) dificultam a utilização do amônio, enquanto valores mais altos de pH diminuem a utilização do nitrato (STREET e SHEAT, 1958; MARTIN e ROSE, 1976). Para um crescimento adequado da maioria das espécies, a faixa de 5 a 6,5 revela o melhor ajuste de pH (PIERIK, 1987). Se os níveis de pH forem inferiores a 4,5 e superiores a 7,8, poderá ocorrer paralisação do crescimento e do desenvolvimento in vitro (MURASHIGE, 1974). A variação de pH no meio de cultura pode ser devida à absorção diferencial do amônio e do nitrato (SINGHA et al., 1987). Durante o crescimento das células o pH do meio de cultura se altera sempre que diferentes íons são absorvidos e os produtos metabólicos são excretados para o meio. O processo de autoclavagem e a estocagem também acidificam os meios de cultura (SKIRVIN et al., 1986).

Reguladores de crescimento

Na cultura de embrião imaturo reguladores de crescimento são, muitas vezes, usados para evitar a germinação precoce ou para estimular o crescimento embrionário. O regulador efetivo para evitar a germinação precoce é o ácido abscísico (ABA), que está normalmente presente no saco embrionário (KING, 1976; HSU, 1979). Dependendo da espécie, o embrião jovem pode ser estimulado a crescer por citocininas, por auxinas ou por giberelinas (FERREIRA e HU, 1998). Há necessidade de utilização de reguladores de crescimento quando os embriões são excisados nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Condições ambientais de cultivo

a) Luz

Os efeitos da luz sobre o desenvolvimento embrionário são pouco estudados. Para o cultivo de embriões jovens, a maioria dos pesquisadores testa, em experimentos preliminares, a necessidade ou não de luz para o

sistema. Em embriões rudimentares de *Ilex*, já se demonstrou que a embriogênese tardia é, em muito, afetada pela luz (HU, 1976; FERREIRA e HU, 1984; 1989). Usualmente, nas câmaras de cultivo a intensidade luminosa é de 3 a 5W.m⁻².

b) Temperatura

A temperatura mais utilizada para incubação é de 25 °C, não importando o tipo de planta; isto parece possibilitar o crescimento embrionário e a germinação, embora não seja o ótimo (FERREIRA e HU, 1998).

c) Transplante

Os fatores a serem considerados para o transplante são a infecção e a dessecação. A esterilização do solo elimina muitos dos problemas de infecção. A dessecação das plântulas é, após o transplante, o grande problema que dificulta o uso de cultura de embrião (FERREIRA e HU, 1998). Alta perda de água foi constatada nas folhas de plantas e imediatamente após o transplante do frasco de cultura para o solo (BRAINERD e FUCHIGAMI, 1981). Como resultado do estresse do transplante pode haver morte do meristema apical ou mesmo da plântula. Um período úmido de aclimação é necessário para as plantas recém-transplantadas se adaptarem ao ambiente externo.

Muitas das plântulas de cultura in vitro têm somente duas raízes longas e finas e, se estas forem danificadas durante o transplante, as plântulas podem morrer; no entanto, se a plântula obtida for vigorosa, novas raízes surgirão no lugar da danificada, não ocorrendo outros prejuízos por esta lesão de manipulação (FERREIRA e HU, 1998).

Aplicações da cultura de embriões

Entre as numerosas aplicações da cultura de embriões, se destacam: a recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis; a micropropagação clonal; a superação de dormência e da esterilidade de sementes (FERREIRA e HU, 1998).

A técnica de cultivo in vitro de embriões tem sido utilizada com sucesso em inúmeros gêneros de plantas, permitindo a superação de barreiras genéticas à germinação (FERREIRA e HU, 1998).

Recuperação de híbridos de cruzamentos incompatíveis

Cruzamentos interespecíficos e intergenéricos podem aumentar a variabilidade genética e serem usados para transferir genes desejáveis entre plantas, sobretudo de espécies silvestres para as cultivadas (GOMATHINAYAGAM et al., 1999). Em tais cruzamentos podem ocorrer barreiras, tanto pré como pós-zigóticas, resultando em sementes com embriões abortivos. A hibridação entre espécies é freqüentemente limitada por falhas no desenvolvimento do endosperma, culminando com a degeneração dos embriões antes que atinjam a maturidade (ANGRA et al., 1999; MALLIKARJUNA, 1999; SUKNO et al., 1999), os quais podem ser salvos se forem removidos antes que ocorra o aborto, e cultivados artificialmente em um meio nutritivo (ASANO e IMAGAWA, 1999).

Wardlaw (1965) revisou o assunto de aborto de embriões em sementes de cruzamentos interespecíficos e observou que nas sementes abortivas de muitos cruzamentos, o primeiro sinal de desenvolvimento anormal aparecia no endosperma e, eventualmente, levava à inanição e ao aborto do embrião. A excisão e a cultura in vitro dos embriões excisados antes do aborto podem superar esta barreira pós-zigótica, recuperando plantas híbridas. O tempo ideal para resgate varia de espécie para espécie ou dentro de uma espécie, de cultivar para cultivar.

O uso de técnicas de salvamento de embrião é importante na obtenção de híbridos interespecíficos e intergenéricos. Com o uso deste método (meio) produtos interessantes foram obtidos em batatas, legumes e várias safras ornamentais. Muitos dos novos híbridos de lírio foram obtidos por meio desta técnica. Diversos estudos têm sido realizados por empresas que trabalham com cultivo de embriões surgindo, assim, muitos híbridos interespecíficos e intergenéricos de interesse. É impossível imaginar um cultivo moderno de plantas sem esta técnica.

Broue et al, (1982) realizaram polinizações controladas entre a soja cultivada e as espécies perenes; na maioria dos casos, porém não ocorreu desenvolvimento das vagens e as flores polinizadas secavam e caíam da planta, em 3 ou 4 dias, apenas em uma pequena porcentagem de cruzamentos houve iniciação da vagem; esses embriões híbridos foram abortados entre 5 e 35 dias após a polinização, devido à degeneração do endosperma, impossibilitando a obtenção de sementes viáveis desses cruzamentos. Para facilitar a sobrevivência dos híbridos interespecíficos, a cultura de óvulos e embriões foi adotada. Embriões, juntamente com o saco embrionário, foram excisados da vagem, 11 a 33 dias após a polinização, e cultivados. Cinco híbridos férteis foram obtidos, abrindo o caminho para a exploração de diversas fontes de germoplasma das espécies perenes de *Glycine*.

A superação das barreiras interespecíficas é um dos mais significativos avanços no melhoramento de plantas, permitindo uma considerável expansão do conjunto gênico do tomateiro cultivado (ARAGÃO et al., 2002).

A cultura de embriões é hoje, dentre as técnicas, a mais intensamente utilizada (NAGAI, 1984; NEAL e TOPOLESKI, 1983; SILVA et al., 1995; SILVA et al., 1998; SIQUEIRA et al., 1988; SMITH, 1944; THOMAS e PRATT, 1981). Mas somente baixas porcentagens de híbridos interespecíficos têm sido obtidas. Silva et al. (1995), produziram híbridos entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*, com taxa de recuperação de embriões em torno de 1%. O sucesso do resgate de híbridos interespecíficos em tais cruzamentos foi aparentemente influenciado por fatores genéticos, com alguns genitores apresentando níveis diferenciais de compatibilidade. Se existe aborto de embrião em um estágio de desenvolvimento muito precoce, as plantas híbridas podem ser resgatadas via formação de calos e subsequente recuperação a partir de massas de células embrionárias. Na maioria dos cruzamentos, a incompatibilidade permanece entre plantas F1, fazendo-se necessário ainda, o uso de cultura de embrião na recuperação de plantas RC1 (ANGORA et al., 1981).

Existem casos em que as barreiras pós-zigóticas não envolvem apenas a degeneração do endosperma. Há situações outras em que o embrião não se desenvolve normalmente, não se significando, portanto, a transição do tipo de desenvolvimento heterotrófico para autotrófico, sendo a cultura de embrião ineficaz (POYSA, 1990). Em geral, espécies silvestres de *Lycopersicon* são tipos polimórficos havendo grande variação morfológica entre e dentro de populações/acessos da mesma espécie, permitindo em muitos casos, que se obtenha hibridação interespecífica com sucesso (KALLOO, 1991); portanto, a variabilidade de diferentes cruzamentos interespecíficos com *L. esculentum* é também utilizada como ferramenta na recuperação de embriões de híbridos interespecíficos (RICK, 1983; SEGEREN et al., 1993).

A técnica de hibridação controlada vem sendo utilizada no melhoramento, obtendo-se sementes dos cruzamentos entre diplóides (AA) e destes com cultivares comerciais de banana do tipo Prata e Maçã (AAB) gerando, respectivamente, híbridos diplóides (AA) e tetraplóides (AAAB) (NEVES et al., 2002). O pequeno número de sementes obtidas nos cruzamentos e a baixa porcentagem de germinação, devido à dormência da semente ou más-formações do endosperma e/ou embrião, têm sido fatores limitantes à obtenção de materiais híbridos (SHEPHERD et al., 1994; SILVA et al., 1997).

A técnica de cultivo in vitro de embriões é utilizada com sucesso em inúmeros gêneros de plantas, permitindo a superação de barreiras genéticas à germinação (FERREIRA e HU, 1998). No caso específico de bananeira tem possibilitado a obtenção de porcentagens de germinação superiores a 50%, enquanto em viveiro, é de apenas 1% (COX et al., 1960; VUYLSTEKE e SWENNEN, 1991).

O resgate de híbridos via cultura de embrião, é uma prática rotineira no melhoramento de banana. Trabalhos conduzidos nesta área têm mostrado grande influência materna na qualidade do endosperma e embrião que, a depender do cruzamento, chega a inviabilizar a recuperação do híbrido (NEVES et al., 2002).

Micropropagação clonal

Em razão de sua natureza juvenil com alto potencial regenerativo, embriões são excelentes explantes para propagação clonal in vitro (HU e FERREIRA, 1998). Embriões imaturos têm sido usados na propagação uma vez que o calo produzido por embriões maduros usualmente não tem potencial morfogênético (OZIAS-AKINS e VASIL, 1983).

Em coníferas, apenas os embriões e plântulas recém-germinadas têm capacidade regenerativa (NORGAARD e KROGSKRUP, 1991; NAGMANI et al., 1982). Em gramíneas forrageiras e cereais a organogênese e a embriogênese somática têm sido observadas a partir de tecido embrionário (RENGEL, 1987 a,b; AKASHI e ADACHI, 1991). O embrião imaturo é o explante mais utilizado nos cereais em geral, para indução de calos e posterior regeneração de plantas (BHASKARAN e SMITH, 1990); além disso, diversos estudos são realizados atualmente para a verificação do estágio ideal do embrião que promova maior porcentagem de calogênese e embriogênese somática com vista à regeneração (ZIMNY e LÖRZ, 1989). Em aveia, embriões extraídos de sementes no estágio de grão leitoso, medindo entre 1 e 3 mm, são capazes de formar calos embriogênicos com grande potencial regenerativo (BREGITZER et al., 1989).

A organogênese é um fenômeno bastante comum em cereais, principalmente em aveia. Heyser e Nabors (1982) observaram pequenas regiões embriogênicas em apenas 21% dos calos de aveia em cultura, enquanto o restante era totalmente organogênico. Grandó et al. (1993) também notaram que a maioria dos calos obtidos a partir de embriões imaturos era organogênica; por outro lado, diversos autores têm constatado variabilidade entre genótipos de diferentes cereais para sua capacidade de regeneração e sugerido que esta característica está sob controle genético (MILACH et al., 1991). Desta forma, genótipos com alta frequência de regeneração de plantas devem ser selecionados com o propósito de transferir esta característica para genótipos superiores que possam ser utilizados no programa de melhoramento. Em aveia também se detectou variabilidade, tanto para embriogênese somática quanto para regeneração de plantas (GRANDÓ et al., 1993; BERED et al., 1996).

Existe, na literatura científica, grande número de trabalhos em que embriões zigóticos maduros ou imaturos, ou parte deles, foram usados como explantes para obtenção de embriões somáticos (FERREIRA e HU, 1998). Os sucessos em *Ilex aquifolium* (HU e SUSSEX, 1971), em *I. cornuta* (HU e OCHS, 1972), *Fagus sylvatica* (VIEITEZ et al., 1992), em *Liriodendron tulipifera* (SOTAK et al., 1991) e *Citrillus lonatus* (COMPTON e GRAY, 1993) são alguns exemplos.

Nas leguminosas também se utiliza o cultivo de embriões como fonte de explantes para diversas espécies como *Pisum sativum* (TÊTU et al., 1990), *Lupinus spp.* (NADOLSKA-ORCZYK, 1992), *Arachis hypogea* (OZIAS-AKINS et al., 1992; EAPEN et al., 1993) e em soja e espécies afins de *Glycine* (RANCH et al., 1985; GHAZI et al., 1986; KERNS et al., 1986; WRIGHT et al., 1987; FINER e NAGASAWA, 1988). Nas cultivares brasileiras de soja IAS5 e IVORA, o uso desses explantes já proporcionou resultados positivos (FERREIRA et al., 1990).

Superação de esterilidade e dormência de sementes

Algumas espécies produzem sementes pseudo-estéreis, que não germinam nas condições normalmente usadas. A pseudo-esterilidade pode ser atribuída ao desenvolvimento incompleto do embrião ou a um tipo de dormência profunda, para a qual um método eficaz de superação de dormência ainda não foi desenvolvido. A técnica de cultura de embriões pode ser capaz de produzir plântulas viáveis dessas sementes (FERREIRA e HU, 1998). A dormência de sementes de muitas espécies se deve a inibidores químicos ou à resistência mecânica presente nas estruturas que recobrem o embrião e não a uma dormência do embrião. A cultura de embrião pode superar este tipo de dormência.

A maior dificuldade do melhoramento em *Ilex* é a demora da germinação das sementes, causada pela natureza rudimentar dos embriões que permanecem imaturos, no estágio cordiforme, durante longo período, depois do amadurecimento do fruto. As sementes de *I. opaca* exigem três anos, sob condições apropriadas, para germinarem; uma fração dessas

sementes poderá germinar depois desses três anos; este modelo cíclico de germinação pode durar 9 anos. Hu (1975) desenvolveu uma técnica de cultura in vitro para os embriões rudimentares de *Ilex*, a qual permite superar este período de dormência das sementes (FERREIRA e HU, 1998).

A técnica de cultura de embrião zigótico in vitro representa uma alternativa importante para trabalhos de melhoramento, que envolve o intercâmbio de germoplasma de coqueiro, solucionando, assim, o problema do tamanho e da ausência de dormência da semente nesta espécie.

Conclusão

A cultura de embriões zigóticos se mostra bastante eficiente na regeneração de embriões de sementes que não germinam em condições convencionais de semeadura; no entanto, sua maior aplicabilidade se dá por meio do resgate de embriões imaturos, a partir de sementes em desenvolvimento.

A técnica de cultivo in vitro de embriões tem sido utilizada com sucesso em inúmeros gêneros de plantas, permitindo a superação de barreiras genéticas à germinação e a introgressão gênica por meio de cruzamentos entre indivíduos de espécies distantes; a micropropagação clonal; a superação de dormência e esterilidade de sementes apresentando, desta forma, alternativas aos programas de melhoramento em suas diferentes fases e, muitas vezes, oferecendo soluções únicas.

Alguns fatores podem afetar o sucesso do cultivo de embriões zigóticos in vitro, como a maturidade fisiológica da semente, a desinfestação da semente, a remoção inadequada do embrião, a escolha do meio nutritivo adequado e os reguladores de crescimento utilizados.

Referências bibliográficas

AKASHI, R.; ADACHI, T. High frequency somatic embryos formation in cultures of immature embryos of guineagrass, *Panicum maximum* Jacq. Japanese Journal of Breeding, v. 41, n.1, p.83-93, 1991.

ANDREOLI, C. Cultura de embriões. In: SIMPÓSIO DE CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, 1., 1985, Brasília. Anais... Brasília: ABCTP/ EMBRAPA, 1986. p. 25-28.

ANGORA, G.; SACCARDO, F. C. M. E.; SREE, R. K. Backcross progenies from *Lycopersicon esculentum* L. x hybrid (L. *esculentum* x L. *peruvianum* Mill). *Z. Pflanzenzucht*, v. 87, p. 153-157, 1981.

ANGRA, D. C.; BARBOSA, M. M.; PRESTES, A. M.; FERNANDES, M. I. B. D. Embryo culture of backcrosses between hybrids of *Triticum aestivum* Thell. and *Agropyron elongatum* Host. & Beauv. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n. 2, p. 209-215, 1999.

ARAGÃO, F. A. S.; RIBEIRO, C. S. C.; CASALI, V. W. D.; GIORDANO, L. B. Cultivo de embriões de tomate in vitro visando a introgressão de genes de *Lycopersicon peruvianum* em L. *esculentum*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 20, n. 4, p. 605-610, dez. 2002.

ARNOLD, S.; ERIKSSON, T. In vitro studies of adventitious shoot formation in *Pinus contorta*. *Canadian Journal of Botany*, v. 59, p. 870-874, 1981.

ASANO, Y.; IMAGAWA, M. Hybrid seed formation among *Dioscorea opposita* Thunb. Cvs Nagaimo, Ichimo, Tsukuneimo and *Dioscorea japonica* Thunb. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Tokyo, v. 68, n. 3, p. 591-597, 1999.

BERED, F.; SERENO, M. J. C. M.; CARVALHO, F. I. F.; FEDERIZZIL, C.; DORNELLES, A. L. C.; LANGE, C. E.; HANDEL, C. L. Avaliação de embriogênese somática em cultivares de aveia (*Avena sativa* L.). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 26, n. 3, p. 371-375, 1996.

BHASKARAN, S.; SMITH, R. H. Regeneration in cereal tissue culture: a review. *Crop Science*, Madison, v. 30, p. 1328-1338, 1990.

BRAINERD, K. E.; FUCHIGAMI, L. J. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of American Society for Horticultural Science*, v. 196, p. 515-518, 1981.

BREGITZER, P.; SOMERS, D. A.; RINES, H. W. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Science*, Madison, v. 29, p.798-803, 1989.

BROUE, P.; DOUGLASS, J.; GRACE, J. P.; MARSHALL, D. R. Interspecific hybridization of soybeans and perennial Glycine species indigenous to Australia via embryo culture. *Euphytica*, v. 31, p.715-724, 1982.

CECCARELLI, N.; LORENZI, R.; ALPI, A. Gibberellin biosynthesis in *Phaseolus coccineus* suspensor. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, v.102, p. 37-44, 1981.

COMPTON, M. E.; GRAY, D. J. Somatic embryogeneis and plant regeneration from immature cotylrdons of watermelon. *Plant Cell Reports*, v.12, p. 61-65, 1993.

COX, E. A.; STOTZKY, G.; GOODS, R. D. In vitro culture of *Musa balbisiana* cola embryos. *Nature*, London, v.185, p. 403-404, 1960.

DIETERICH, K. Über Kultur von embryonen ausserhalb des samens. *Flora*, v.117, p. 379-417, 1924.

EAPEN, S.; GEORGE, L.; RAO, P.S. Plant regenerayion through somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Biologia Plantarum*, v. 35, n. 4, p. 499-450, 1993.

FERREIRA, A. G.; HU, C.Y. Cultura de Embriões. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: Embrapa - SPI/Embrapa - CNPH, 1998. p. 371-393.

FERREIRA, A. G.; HU, C. Y. Influência da luz na embriogênense tardia de *Ilex* – Culturas in vitro. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 34., 1984, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: SBB, 1984. p. 441-449.

FERREIRA, A. G.; HU, C. Y. Light-mediated inhibition of in vitro late embryogeny of *Ilex*. *Journal of American Society for Horticultural Science*, v.114, p. 819-823, 1989.

FERREIRA, A. G.; HU, C. Y.; SANTAREM, E. R. Somatic embryogenesis of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), Brazilian cultivars Ivoará and IAS-5. *Phyton*, v. 51, p.139-144, 1990.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A.; Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-CNPH, 1998. p. 21-44.

FERREIRA, M. G. R.; CÁRDENAS, F. H. N.; CARVALHO, C. H. S. C.; CARNEIRO, A. A.; DANTAS FILHO, C. F. Resposta de eixos embrionários de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) à concentração de sais, doses de sacarose e renovação do meio de cultivo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 246-248, 2002.

FERRI, M. G. *Botânica: morfologia interna das plantas (anatomia)*. 9. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 114p.

FINER, J. J.; NAGASAWA, A. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v.15, p.125-136, 1988.

FOLEY, M. E. Effect of soluble sugars and gibberelic acid in breaking dormancy of excised wild oat (*Avena fatua*) embryos. *Weed Science*, v. 40, p. 208-214, 1992.

GHAZI, T. D.; CHEEMA, H. V.; NABORS, M. W. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max*. L. *Plant Cell Reports*, v. 5, p. 452-456, 1986.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L.; TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Londrina, v. 5, n. 2, p.139-144, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 1990. p. 99-169.

GOMATHINAYAGAM, P.; RAM, S. G.; RATHNASWAMY, R.;
RATHNASWAMY, N. M. Interspecific hybridization between *Vigna*
unguiculata (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through in vitro embryo
culture. *Euphytica*, Wageningen, v. 102, n. 2, p. 203-209, 1999.

HANNIG, E. Zur physiologie pflanzlicher embryonen. 1. Ueber die cultur von
38 cruciferen-embryonen ausserhalb des embryosack. *Botanic Ztg.*, v. 62,
p. 45-80, 1904.

HEYSER, J. W.; NABORS, M.W. Long term plant regeneration, somatic
embryogenesis and green spot formation in secondary oat (*Avena sativa* L.)
callus. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, Stuttgart, v. 107, p. 153-160,
1982.

HSU, F. C. Absciscic acid accumulation in developing seeds of *Phaseolus*
vulgaris L. *Plant Physiology*, v. 63, p. 552-556, 1979.

HU, C. Y. In vitro culture of rudimentary embryos of eleven *Ilex* species.
Journal of American Society for Horticultural Science, v. 100, p. 221-225,
1975.

HU, C. Y.; OCHS, J. D. Development of embryoids from *Ilex aquifolium*,
and *L. cornuta*. *Plant Physiology*, v. 49, p. 31, 1972. Abstract. Supplement.

HU, C. Y.; SUSSEX, I. M. In vitro development of embryoids on cotyledons
of *Ilex aquifolium*. *Phytomorphology*, v. 21, p. 103-107, 1971.

KALLOO, G. Interespecific and intergeneric hibridization in tomato. In:
Genetic improvement of tomato. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 73 - 82.

KERNS, H. R.; BARWALE, U. B.; MEYER JUNIOR, M. M.; WIDHOLM, J. M.
Correlations of cotyledonary node shoot proliferation and somatic embryoid
development in suspension cultures of soybean (*Glycine max* (L.)). *Plant*
Cell Reports, v. 5, p. 140-143, 1986.

KING, R. W. Absciscic acid in developing wheat and its relationship to grain
growth and maturation. *Planta*, v. 132, p. 43-51, 1976.

KNUDSON, L. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Botanical Gazette, v. 73, p.1-25, 1922.

KRIKORIAN, A. D. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. In: ROCA, W.M.; MROGINSKI, L.A. (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cali: CIAT, 1991. p. 41-776.

KUMAR, A.; BENDER, L.; NEUMANN, K. H. Growth regulation, plastid differentiation and the development of a photosynthetic system in cultured carrot root explants as influenced by exogenous sucrose and various phytohormones. Plant Cell, Tissue and Organ Tissue Culture, Dordrecht, v. 4, p. 11-28, 1984.

LAIBACH, F. Das taubwerden von bastardsamen und die künstliche aufzucht früh absterbender bastardembryonen. Zeitschrift fuer Botanic, v.17, p. 417-459, 1925.

MALLIKARJUNA, N. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interespecific incompatible pollinations in chickpea. Euphytica, Wageningen, v. 110, n. 1, p. 1-6, 1999

MARTIN, S. M.; ROSE, D. Growth of plant cell (Ipomoea) suspension cultures at controlled pH levels. Canadian Journal of Botany, v. 54, p.1264-1270, 1976.

MILACH, S. C. K.; FEDERIZZI, L. C.; CARVALHO, F. I. F.; DORNELLES, A. L. C.; LANGE, C. E. Regeneração de plantas no cultivo de calos de genótipos brasileiros de trigo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 26, p.1947-1956, 1991.

MONNIER, M. Culture of zygotic embryos. In: THORPE, T. A. (Ed.). Frontiers of plant tissue culture. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture, 1978. p. 277-295.

MURASHIGE, T. Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, v. 25, p.135-166, 1974.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 15, n. 6, p. 473-479, 1962.

NADOLSKA-ORCZYK, A. Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius* L., *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 28, p.19-25, 1992.

NAGNAMI, R.; DINER, A. M.; SHARMA, G. C. Somatic embryogenesis in longleaf pine (*Pinus palustris*). *Canadian Journal for Research*, v. 88, p.137-160, 1982.

NAGAI, H. Criação de variedades de tomate resistentes a viroses. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 9, n. 2, p. 307-308, 1984.

NEAL, C. A.; TOPOLESKI, L. D. Hormonal regulation of growth and development of tomato embryos in vitro. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 110, p. 869-873, 1983.

NEVES, T. S.; SILVA, S. O. S.; OLIVEIRA, R. P. Desenvolvimento in vitro de plântulas de diplóides de bananeira obtidas a partir de cultura de embriões. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 6-9, abr. 2002.

NORGAARD, J. V.; KROGSTRUP, P. Cytokinin induced somatic embryogenesis from immature embryos of *Abies nordmanniana* Lk. *Plant Cell Reports*, v. 9, p. 509-513, 1991.

NUÑIZ, J. F. V.; BECERRIL, J. M. C. Práticas de mejora vegetal. 1996. Monografia.

OZIAS-AKINS, P.; ANDERSON, W. F.; HOLBROOK, C. C. Somatic embryogenesis in *arachis hypogaea*: genotype comparison. *Plant Science*, v. 83, p. 103-111, 1992.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Improved efficiency and normalization of somatic embryogenesis in *Triticum aestivum* (wheat). *Protoplasma*, v. 117, p. 40-44, 1983.

OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Plant regeneration from cultured immature embryos and inflorescences of *Triticum aestivum* L.: evidence for somatic embryogenesis. *Protoplasma*, New York, v. 110, p. 95-105, 1982.

PARIS, D.; RIETSEMA, J.; SATINA, S.; BLAKESLEE, A. F. Effect of amino acids, especially aspartic and glutamic acid their amides on the growth of *Datura stramonium* embryos in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 39, p.1205-1212, 1953.

PASQUAL, M. *Cultura de tecidos vegetais: tecnologia e aplicações, meios de cultura*. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 74 p.

PASQUAL, M.; PINTO, J. E. B. P. Cultura de embriões. *Notícias da Associação Brasileira de Cultura de Tecidos de Plantas*, Brasília, v. 9, p. 2-12, ago. 1988.

PIAGESSE, A.; PICCIARELLI, P.; LORENZI, R.; ALPI, A.; Gibberellins in embryo-suspensor of *Phaseolus coccineus* seeds at the heart stage of embryo development. *Plant Physiology*, v. 91, p. 362-366, 1991.

PICCIARELLI, P.; PIAGESSE, A.; ALPI, A. Gibberillins in suspensor, embryo and endosperm of developing seeds of *Cytisus laburnum*. *Phytochemistry*, v. 30, n. 6, p.1789-1792, 1991.

PIERIK, R. L. M. *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht: Martinus Nyjhoff, 1987. 344p.

POYSA, V. The development of bridge lines for interespecific gene transfer between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 79, p. 187-192, 1990.

RAGHAVAN, V. Embryo culture. In: BOHM, H. (Eds.). *International Review of Citology*. Colombus: Academic Press, n. 11, 1980. p. 209-239.

RAGHAVAN, V. Nutrition growth and morphogenesis of plant embryos. *Biological Review*, v. 41, p.1-58, 1966.

RAGHAVAN, V.; TORREY, J. G. Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of capsella in culture. *Plant Physiology*, v. 39, p. 691- 699, 1976.

RANCH, J. P.; OGLESBY, L.; ZIELINSKI, A. C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, v. 21, p. 653-658, 1985.

RAPPAPORT, J. In vitro cultures of plant embryos and factors controlling their growth. *Botanical Review*, v. 20, p. 201-225, 1954.

RENGEL, Z. Embryogenic callus induction and plant regeneration from cultivated *Hordeum vulgare* mature embryo. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 25, n.1, p. 43-48, 1987a.

RENGEL, Z. Factors involved in initiation of somatic embryogenesis in cereal tissue culture. *Acta Botanica Croatica*, v. 46, p. 33-43, 1987b.

RICK, C. M. Crossability between *L. esculentum* and a new race of *L. peruvianum*. *Tomato Genet. Coop. Rep.*, v. 333, p. 13, 1983.

RIJVEN, A. H. G. C. Effects of glutamine, asparagine and other related compounds on the in vitro growth of embryos of *Capsella bursapastoris*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, v. 58, p. 368-376, 1955.

SCOTT, P.; LYNE, R. L. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 37, p. 61-65, 1994.

SEGEREN, M. I.; SONDAHL, M. R.; SIQUEIRA, W. J.; MEDINA FILHO, H. P.; NAGAI, H.; LOURENÇÃO, A. L. Tomato breeding. 1. Embryo rescue of interspecific hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *L. peruvianum* (L.) Mill. *Revista Brasileira de Genética*, Ribeirão Preto, v. 16, p. 367-380, 1993.

SHEPHERD, K.; DANTAS, J. L. L.; SILVA, S. O. Breeding of Prata and Maçã cultivars for Brazil. In: INIBAP. The improvement and testing of Musa; a global partnership. Honduras. 1994. p.157-168.

SILVA, C.; ARAGÃO, F. A. S.; GIORDANO, L. B. Introgressão de genes de resistência à *Septoria lycopersici* de *Lycopersicon peruvianum* em tomate. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 16, n.1, 1998. Resumo.

SILVA, C.; GIORDANO, L. B.; SANTOS, J. R. M. Híbridos interespecíficos entre *L. esculentum* e *L. peruvianum*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v. 13, n. 1, p. 113, 1995. Resumo.

SILVA, S. O.; MATOS, A. P.; ALVES, E. J.; SHEPHERD, K. Breeding 'Prata' (Pomme) and 'Maçã' (Silk) banana types current achievements and opportunities. *Infomusa*, Montpellier, v. 6, n. 2, p. 7-10, 1997.

SINGHA, S.; OBERLY, G. H.; TOWNSEND, E. C. Changes in nutrients composition and pH of culture medium during in vitro shoot proliferation of crabapple and pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 2, p. 209-220, 1987.

SINGH, M.; KRIKORIAN, A. D. White's standard nutrient solution. *Annals of Botany*, London, v. 47, p.133-139, 1981.

SIQUEIRA, W. J.; FONSECA, M. I. S.; SONDHAL, M. Regeneração de plantas híbridas entre *L. esculentum* e *L. peruvianum* a partir de calos com dois anos de cultura "in vitro". *Bragantia*, v. 47, n. 1, p. 1-8, 1988.

SKIRVIN, R. M.; CHU, M. C.; MANN, M. L; YOUNG, H.; SULLIVAN, J.; et al. Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, v. 5, p. 292-294, 1986.

SMITH, P. G. Embryo culture of tomato species hybrid. *American Society for Horticultural Science*, v. 44, p. 413-416, 1944.

SOTAK, R. J.; SOMMER, H. E.; MERKLE, S. A. Relation of the development stage of zygotic embryos of yellow-poplar to their somatic embryogenic potencial. *Plant Cell Reports*, v.10, p.175-178, 1991.

STIVAL, A. L. Aspectos fisiológicos, anatômicos e agrônômicos da indução e regeneração de duplo-haplóides androgenéticos em genótipos brasileiros de cevada (*Hordeum vulgare* L.). 1995. 101f. Dissertação (Mestrado) - UFRGS, Porto Alegre.

- STREET, H. E.; SHEAT, D. E. G. The absorption and availability of nitrate and ammonia. In: RUHLAND, W. (Ed.). Encyclopedia of plant physiology. Berlin: Springer-Verlag, 1958. v. 8, p.150-165
- TAUTORUS, T. E.; FOWKE, L. C.; DUNSTAN, D. I. Somatic embryogenesis in conifers. Canadian Journal of Botany, v. 69, p. 1873-1899, 1991.
- TÉTU, T.; SANGWAN, R. S.; SANGWAN-NORREEL, B. S. Direct somatic embryogenesis and organogenesis in cultured immature zygotic embryos of *Pisum sativum* L. Journal Plant Physiology, 1990. p.102-109.
- THOMAS, B. R.; PRATT, D. Efficient hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *L. peruvianum* via embryo callus. Theoretical and Applied Genetics, v. 59, p. 215-219, 1981.
- VIEITEZ, F. J.; BALLESTER, A.; VIEITEZ, A. M. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of *Fagus sylvatica* L. Plant Cell Reports, v.11, p. 609-613, 1992.
- VUYLSTEKE, D.; SWENNEN, R. Biotechnological approaches to plantain and banana improvement at IITA. In: Cell and Tissue Culture, Ibadan: 1991. p.143-149.
- WARDLAW, C. W. Physiology of embryonic development in eukaryotes. In: RUHLAND, W. Encyclopedia of plant physiology. Berlin: Springer-Verlag, 1965. v.15, p. 844-965.
- WAREING, P. F.; PHILLIPS, I. D. J. The control of growth & differentiation in plants – Great Britain: Pergamon Press, 1970.
- WRIGHT, M. S.; WILLIAMS, M. H.; PIERSON, P. E.; CARNES, M. G. Initiation and propagation of *Glycine max* (L.) Merr.: Plants from tissue cultured epicotyls. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, v. 8, p. 83-90, 1987.
- ZIMNY, J.; LÖRZ, H. High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration of rye (*Secale cereale* L.). Plant Breeding, Berlin, v. 39, p. 98-103, 1989.

Embrapa

Algodão

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

